

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-508987

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)10月13日

(51)Int.Cl.⁵
C 12 N 5/08

識別記号

序内整理番号

F I

8412-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平4-510046
(86) (22)出願日 平成4年(1992)4月9日
(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)10月12日
(86)国際出願番号 PCT/US92/02895
(87)国際公開番号 WO92/18615
(87)国際公開日 平成4年(1992)10月29日
(31)優先権主張番号 682, 344
(32)優先日 1991年4月9日
(33)優先権主張国 米国(US)
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL,
SE), CA, JP, US

(71)出願人 インディアナ・ユニバーシティ・ファンデーション
アメリカ合衆国インディアナ州47402, ブルーミントン, ピー・オー・ボックス
500, ショーウォルター・ハウス(番地なし)
(72)発明者 ホフマン, ロナルド
アメリカ合衆国インディアナ州46220, インディアナポリス, ノース・ペンシルバニア・ストリート 5305
(74)代理人 弁理士 湯浅 勝三 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 造血細胞を支持するシステム及び方法

(57)【要約】

造血原始細胞を支持するために有効な少なくとも一種のサイトカインを含み、好ましくは実質的に間質細胞を含まない培地中で造血原始細胞を支持する方法。

特表平6-508987 (2)

請求の範囲

- 骨髓細胞を、実質的に間質細胞を含まず、かつ、試験細胞を培養するのに有効的な少なくとも1種類のサイトカイン (cytokine) を含む培養培地で維持する: ことよりなる、培養培地中で哺乳類の骨髓細胞を培養する方法。
- 骨髓細胞が造血幹細胞である請求項1に記載の方法。
- 骨髓細胞が造血原始細胞である請求項1に記載の方法。
- 骨髓細胞がCD34+DR-CD15-細胞である請求項1に記載の方法。
- 少なくとも1種類のサイトカインがIL-1:IL-3:IL-6:MGF:GM-CSF/IL-3の融合タンパク質からなる群から選択される請求項1に記載の方法。
- 骨髓細胞を、該細胞を培養するのに効果的な複数のサイトカイン (cytokine) の組み合わせを含む培養培地で培養する: ことよりなる、培養培地中で哺乳類の骨髓細胞を培養する方法。
- 培養培地が実質的に間質細胞を含まない、請求項6に記載の方法。
- 骨髓細胞が造血幹細胞である請求項6に記載の方法。
- 骨髓細胞が造血原始細胞である請求項6に記載の方法。
- 骨髓細胞がCD34+DR-CD15-細胞である請求項6に記載の方法。
- 培養培地が下記のサイトカインの組み合わせ: IL-1とIL-3: IL-3とIL-6: IL-3とMGF: IL-3とGM-CSF: およびMGFとGM-CSF/IL-3の融合タンパク質: のうち少なくとも1つの組み合わせを含む請求項7に記載の方法。
- 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖したCD34+DR-CD15-の細胞群。
- 7日以上15日を超えない時間で倍に増殖した請求項12に記載の細胞群。
- 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖した細胞群。
- 培養培地がMGFを含む、請求項1に記載の方法。
- 培養培地が実質的に血清を含まない、請求項11に記載の方法。
- 培養培地が実質的に血清を含まない、請求項28に記載の方法。
- 培養培地がMGFと他のサイトカインの組み合わせを含む、請求項28に記載の方法。
- 培養培地がMGFと他のサイトカインの組み合わせを含む、請求項30に記載の方法。
- 請求項27に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖した骨髓細胞の細胞群。
- 請求項27に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖した造血幹細胞の細胞群。
- 請求項27に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖した造血原始細胞の細胞群。
- 請求項28に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖した骨髓細胞の細胞群。
- 請求項28に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖した造血幹細胞の細胞群。
- 請求項28に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖した造血原始細胞の細胞群。
- 培養物がMGFを含む、請求項20に記載の組成物。
- 培養物が実質的に血清を含まない、請求項20に記載の組成物。
- 培養物がMGFを含む、請求項23に記載の組成物。
- 培養物が実質的に血清を含まない、請求項23に記載の組成物。

倍に増殖した 骨髄細胞の細胞群。

- 7日以上15日を超えない時間で倍に増殖した請求項14に記載の細胞群。
- 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖した造血幹細胞の細胞群。
- 7日以上15日を超えない時間で倍に増殖した請求項16に記載の細胞群。
- 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を超えない時間で倍に増殖した造血原始細胞の細胞群。
- 7日以上15日を超えない時間で倍に増殖した請求項18に記載の細胞群。
- 実質上間質細胞を含まず、少なくとも1種類のサイトカインを含み、かつ、15日を超えない時間で倍に増殖した細胞群を有する哺乳類の骨髓細胞増殖培養物からなる組成物。
- 細胞群が、7日以上15日を超えない時間で倍に増殖したものである請求項20に記載の組成物。
- 少なくとも1種類のサイトカインがIL-1:IL-3:IL-6:MGF:GM-CSF/IL-3の融合タンパク質およびGM-CSFからなるグループから選択される請求項20に記載の組成物。
- 複数のサイトカインの組み合わせを含み、かつ、15日を超えない時間で倍に増殖した細胞群を有する哺乳類の骨髓細胞増殖培養物からなる組成物。
- 細胞群が、7日以上15日を超えない時間で倍に増殖したものである請求項22に記載の組成物。
- 培養物が実質的に間質細胞を含まない請求項23に記載の組成物。
- 培養物が、下記のサイトカインの組み合わせ: IL-1とIL-3: IL-3とIL-6: IL-3とMGF: IL-3とGM-CSF: およびMGFとGM-CSF/IL-3の融合タンパク質: のうち少なくとも1つを含む請求項23に記載の組成物。
- 培養培地が実質的に血清を含まない、請求項1に記載の方法。

明細書

造血細胞を支持するシステム及び方法

本出願は、1991年4月9日出願の米国出願第01/682,344号の部分継続出願である。

本発明はヒトの幹細胞を支持するシステム及び方法に関するものであり、より詳しく言えば本発明は骨髓移植患者に用いるための造血幹細胞の支持に関するものである。

哺乳動物の造血は多様な長期骨髄培養システムの利用を通じてインビトロで研究されてきた(3,10-12)。デクスター(Dexter)及び共同研究者ら(3)はネズミの系について述べており、そこではCFU-S及びCFU-GMを、より限られた期間に出現する赤血球前駆細胞及び巨核球前駆細胞について数ヶ月間アッセイすることができた。これらの培養の維持は、内皮細胞、脂肪細胞、網織細胞及びマクロファージから成る付着性基質細胞層の形成に依存した。これらの方法は直ちにヒト骨髄の研究に適応された。ヒトの長期培養システムにおいて、アッセイ可能な造血原始細胞が8又は9週間発生したことが報告され(10,11)、後に最高20週間発生したことが報告された(12,13)。このような培養も又、多数の不均質な骨髓細胞群が頻繁に再接種で基質細胞層が予め定着していることに頼っている。造血幹細胞は、より遠んだ原始細胞を発生及び放出する前に、この付着性細胞の多層層に存在し付着していることが示されている(1,14,15)。基質細胞は、幹細胞がそこに存在するための物理的マトリックスを提供するだけでなく、幹細胞の増殖及び分化に必要な膜接觸信号及び/又は造血成長因子を生産すると考えられる(4,5,16,17)。付着性細胞層を含むこの不均質細胞混合物は本質的に複雑な系を提供し、幹細胞の成長に影響を及ぼす別々の要因をこの系から単離することは困難であることが判明している。

最近、ヒト骨髓細胞に対する組み換えヒト幹細胞因子(MGF)の単独及び組み換えヒトコロニー刺激因子: GM-CSF、IL-3及びエリスロポエチンと組み合わせての刺激作用を調べる研究がマックニース及びラングレイ(McNiece and Langley)

特表平6-508987 (3)

によって行われた。その結果は、低密度の非付着性、抗体産生CD34⁺細胞の MGF刺激は MGFが骨髓及び赤血球に分化できる原始細胞を直接刺激することを示唆している(18)。

本発明の一面に従えば、哺乳動物の骨髓細胞を支持する方法であって、そのような細胞が基質細胞を本質的に欠く培地で維持され、そのような細胞を支持するのに有効な最低一種のサイトカインを含む方法が提供される。

本発明のこの一面の好ましい態様においては、造血幹細胞である骨髓細胞を支持する方法、造血原始細胞である骨髓細胞を支持する方法、及びCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞である骨髓細胞を支持する方法が提供される。

加えて、本発明は最低一種のサイトカイン類が以下のサイトカイン類：インテロイキン(IL)-1、IL-3、IL-6、颗粒球/マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)、ヒト又はネズミ肥満細胞成長因子(MGF)とも呼ばれることがあるヒト又はネズミ幹細胞因子、及び GM-CSF/IL-3の融合蛋白質(FP)から選択されるそのような方法を提供する。さらに、本発明はサイトカイン MGFを唯一のサイトカインとして、又は最低一種の他のサイトカインと組み合わせて含む特に好ましい態様を提供する。

本発明の他の一面に従えば、哺乳動物の骨髓細胞を支持する方法であって、そのような細胞を支持するのに有効なサイトカイン類の組合せを含む培地中でそのような細胞が維持される方法が提供される。好ましくは、骨髓細胞は基質細胞を本質的に欠く培地中で支持されることになる。

本発明の他の一面は、哺乳動物の骨髓細胞を支持する方法であって、そのような細胞が血清及び基質細胞を本質的に欠く培地中で維持される方法を提供する。このシステムは原始細胞の好ましい増殖を可能ならしめ、どのサイトカインが原始細胞の増殖に特異的に影響を及ぼすかの同定を可能にする。

本発明の他の一面は、哺乳動物の骨髓細胞を支持する方法であって、そのような細胞が本質的に血清を含まね長期懸濁ヒト骨髓である培養システムで維持される方法を提供する。このシステムはヒト原始細胞の好ましい増殖を可能ならしめ、どのサイトカインがヒト原始細胞の増殖に特異的に影響を及ぼすかの同定を可能にする。好ましくは、該培地は本質的に基質細胞を欠いている。

原に対して陽性であり、HLA-DRに対して陰性であり、且つ CD15 に対しても陰性である。

とりわけ、本発明のこの一面は上記の方法に従って支持されるCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞群を提供し、該細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は7ないし15日間で倍増する。

他の一面によれば、本発明はここに述べる方法に従って支持される骨髓細胞の細胞群を提供し、該細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は7ないし15日間で倍増する。

他の一面によれば、本発明はここに述べる方法に従って支持される造血幹細胞の細胞群を提供し、該細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は7ないし15日間で倍増する。

他の一面によれば、本発明はここに述べる方法に従って支持される造血原始細胞の細胞群を提供し、該細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は7ないし15日間で倍増する。

本発明の他の一面は、本質的に基質細胞を欠く培養した骨髓細胞培養を含む組成物を提供し、該培養は最低一種のサイトカインも含み、さらに該培養細胞群は15日を越えない期間中に倍増する。好ましくは、該細胞群は最低7日間で15日を越えない間に倍増する。

ヒトの長期骨髄培養(LTBM)は、インビトロでの持続的造血のために付着性基質細胞層の形成を必要とするものと考えられてきた。ヒト骨髓細胞のCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 群は、継続的にサイトカインが供給されるならば基質細胞なしに長12週間まで、多系列の分化、自己再生、及び LTBMの開始が可能である。好ましくは、供給されるサイトカインはインテロイキン-3 (IL-3) である。 LTBMにおけるIL-3の存在下及び非存在下でのCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞に対する基質細胞の作用は観察されている。基質の非存在下でのCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞の懸濁培養は、IL-3が供給されるならば、高率の細胞増殖及び多系列原始細胞増殖により証明されるようない10-12 週間の持続的造血を特徴とした。これらの培養中には付着性の層は形成されず、1週間以上生存させるにはIL-3が必要であった。このような基質フリーの培養は 500から 800以上のアッセイ可能な CPU-GM を12週間以上生産し、

この発明の他の好ましい態様により、造血幹細胞である骨髓細胞を支持する方法、造血原始細胞である骨髓細胞を支持する方法、及びCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞である 骨髄細胞を支持する方法が提供される。

好ましくは、該培地は以下のサイトカインの組合せ：IL-1/IL-3； IL-3/IL-6； IL-3/MGF； IL-3/GM-CSF； MGF/FP の内の最低 1種を含むことになる。出願人はこのような組合せが該細胞群の改良された迅速な増殖を提供することを見出した。

幹細胞及び他の原始細胞に関する“支持する”という用語は、そのような細胞を維持し及び/又は増殖させ及び/又は何らかの分化を促進させることを意味する。

以下に示すものは本発明において使用してもよいサイトカイン類の代表例である：すなわち、該細胞を支持するのに有効な量のIL-1。一般に、このような量は最低 20 pg/ml であり 1ng/ml を越える必要はなく、好ましくは 1ng/ml である；該細胞を支持するのに有効な量のIL-6。一般に、このような量は最低 20 pg/ml であり 1ng/ml を越える必要はなく、好ましくは 1ng/ml である；該細胞を支持するのに有効な量のIL-3。一般に、こののような量は最低 1ng/ml であり 50ng/ml を越える必要はなく、好ましくは 10ng/ml である；該細胞を支持するのに有効な量のIL-1。一般に、こののような量は最低 1ng/ml であり 50ng/ml を越える必要はなく、好ましくは 10ng/ml である；該細胞を支持するのに有効な量のGM-CSF。一般に、こののような量は最低 100 pg/ml であり 1ng/ml を越える必要はなく、好ましくは 200 pg/ml である；該細胞を支持するのに有効な量の MGF。一般に、こののような量は最低 10 ng/ml であり 50ng/ml を越える必要はなく、好ましくは 5 0ng/ml である；及び、該細胞を支持するのに有効な量のFP。一般に、こののような量は最低 1ng/ml であり 10ng/ml を越える必要はなく、好ましくは 10ng/ml である。このようなサイトカイン類は単独又は互いに組み合わせて使用してもよい。

基質細胞の非存在下でサイトカインを使用することは、特に哺乳動物の骨髓細胞、とりわけ原始細胞を増殖させるのに特に適している。本発明に従って支持される細胞は好ましくはヒトを起源とするものである。

本発明の好ましい一面に従えば、本発明に従って支持される細胞群は CD34 抗

BFU-E は 1-3週間発生した。対照的に、外因性のIL-3の存在下及び非存在下の両方において、自己のCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞を再添加した4週間の基質培養は、わずか6週間の間アッセイ可能なコロニー形成細胞をはるかに少ない(100-500) 数しか発生せず、非付着性細胞の生産は12週間の観察期間を通じて非常に減少した。IL-3は追加したがCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞は再培養していない基質培養はソーティングされた細胞が加えられた培養と同様の挙動を示した。これらのデータは骨髓基質細胞が、造血幹細胞の発達及び増殖に対するサイトカインの作用を調節し、インビトロの造血の促進及び低下の両方に働く信号を精密に作り上げていることを示唆する。

本発明の別の一面は、増殖した骨髓細胞培養を含む組成物を提供し、該培養はサイトカインの組合せを含み、さらに該培養細胞群は15日を越えない期間中に倍増したものである。好ましくは、該細胞群は最低7日間で15日を越えない間に倍増したものである。該細胞群が本質的に基質細胞を含まないことも好ましい。

先に示したように、本発明はCD34抗原に対して陽性であるがHLA-DR抗原及びCD15抗原は発現しない骨髓細胞に対して、そのような細胞群がヒトの造血幹細胞に密接に関係するものと考えられるために特に適用できるが、本発明がそのような細胞群を支持することに限定されるものではないことを理解すべきである。

本発明に従って支持される細胞は多様な方法で使用してもよい。例えば、そのような細胞は骨髓移植装置の一部として用いてもよい。

培養させた造血幹細胞群は、悪性腫瘍、骨髓不全症、並びに先天性的代謝、免疫及び造血疾患を治療するための骨髓移植用の移植体として使用することができる。骨髓サンプルは患者から採取され、CD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞は密度遠心分離、逆流遠心エルトリエーション(counter flow elutriation)、モノクローナル抗体ラベル化、及び蛍光活性化細胞ソーティングによって単離される。この細胞群中の幹細胞がその後インビトロで増殖され、自己骨髓移植用の移植体として用いられることがある。該移植体は、患者が治療用の化学放射線治療を受けた後に注入されることになる。

培養させた幹細胞群は又、妊娠第一トリメスター期における子宮内移植に利用

することもできる。代謝及び造血疾患を持つ胎児が胎内で診断されることがある。骨髄を正常な個体から採取し、CD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞を先に述べた方法により得てインビトロで増殖させることができる。それらをその後、子宮内注射によって胎児に投与してよい。キメラが形成され、それにより臨床的異常性の部分的ながら臨床に重要な緩和を導くことになる。

本発明を以下の実施例についてさらに述べるが、本発明の範囲はそれらに限定されるものではない。

実施例1

A. 材料と方法

いずれの処置を行う場合もそれに先立ち、インディアナ医科大学のヒューマン・インペスティゲイション・コミッティのガイドラインに従ってボランティア全員からインフォームド・コンセントを得た。

細胞分離法。 胎児は健常なボランティアの後部腰骨髄から吸引採取した。低密度腰椎骨髓(LDBM)細胞は、ヘパリン処理した骨髄をフィコールーベイグ(ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社、ピクスキャタウェイ、NJ)上で500 g、25分間、密度遠心分離して得た。LDBM細胞はPBS-EDTA(5% PBSを含有するPBS、pH 7.4、0.01% EDTA wt/vol、及び1.0 g/l D-グルコース)中に懸濁し、JA-17ローター及び標準分離チャンバー(ベックマン・インストルメント社、パロ・アルト、CA)を用いて10°C、1,850 rpmのローター速度のエルトリエイター・システム中に注入した。12-14 ml/minの流速で溶出し、遠血前壁が液滅されたLDBMのフラクション(FR 12-14)を文献記載のよう(2)回収した。

基質細胞を含まない長期骨髄培養。 プラスチック型35-mm組織培養皿に10% FBSおよび2x10⁻⁸Mメチルブレニゾロンを含むイスコブ培地1 ml中に2x10⁶ LDBM細胞を接種した。培養細胞は空気中に5% CO₂を含む湿度100%の環境下、37°Cでインキュベートし、週1回培地を全交換することにより栄養供給した。基質細胞は4-5週までにコンフルエントに達した。基質細胞培養にその後1.5 00ラドで放射線照射し、培地を交換して、該培養物に自己ドナーからの5x10⁶の

ソーティングした骨髄細胞をイノキュレートした。これらの培養の培地は1-10日ごとに除去して新しい培地と交換した。懸濁している非付着性細胞をカウントし、原始細胞のアッセイを行った。

長期骨髄培養。 10% FBSを含むイスコブ培地1 mlの入ったプラスチック型35-mm組織培養皿に、ソーティングによって得られた5x10⁶細胞を含む、基質細胞を含まない長期骨髄細胞をイノキュレートし、空気中に5% CO₂を含む湿度100%の環境下、37°Cでインキュベートした。この時点、及びその後48時間毎に、培養物に対照液(1% BSA/PBS)、2.5 U/ml IL-1 α 、50 U/ml IL-3、75 U/ml IL-6、12.5 U/ml GM-CSF、又はそれらの組合せを加えた。7日間ごとに、培養容積の2分の1を除去し新しい培地と交換することによって培養の細胞数を半減させた。採取した培地中の細胞をカウントし、染色及び形態学試験のためにスライドに移し、種々の原始細胞に対するアッセイを行った。

造血成長因子。 サイトカイン類は全てジェンザイム社、ボストン、MA、から入手した。組み換え IL-1 α 及びIL-6はそれぞれ10⁶ CFU/ng蛋白の比活性を有したが、IL-6の比活性は10⁷ CFU/ng蛋白で、顆粒球/マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)の比活性は5x10⁷ CFU/ng蛋白であった。

2-及び3色細胞ソーティング。 FR 12-14の細胞を「gG: サブクラスのマウス・モノクローナル抗体 NPCA-1(CD34)(ベクトン・ディキンソン・イムノサイトメトリイ・システムズ社、サン・ノゼ、CA)と共にインキュベートし、洗浄して、テキサス・レッドを結合させたサブクラス特異性ヤギ抗マウスIgG₁(ザサン・バイオテクノロジイ・アソシエイツ社、バーミンガム、AL)で染色した。次いで細胞をマウス血清とインキュベートして、二次抗体上の非結合活性部位を全てブロックした。細胞を最後にフィコエリスリン結合のマウス抗HLA-DR单株又はFITC結合のCD33(M99、コウルター・イムノロジイ社、ハイアレア、FL)、CD15(Leu-M1)、或いはCD71(転移受容体)(ベクトン・ディキンソン・イムノサイトメトリイ・システムズ社)と組み合わせたもののいずれかにより染色した。CD15は顆粒球及び单球系の細胞上に存在し、細胞群からこれらの細胞成分を除去することを期待して抗-CD15モノクローナル抗体を使用した(6)。CD71は活発に増殖中の細胞上に存在し、活発に増殖中の細胞をより静止状態の骨髄成分から離

するために抗-CD71抗体を利用した(7)。アイソタイプの合う対応する非特異性骨髄細胞蛋白から成る対照を、モノクローナル抗体の染色と同時に使用した。細胞は2x10⁶/mlの濃度で染色し、各ステップの後に1% BSAを含むPBSで洗浄した。該処理期間を通して、温度は4°Cに維持された。

染色後直ちに、細胞をコウルター・エピックス753デュアルレーザー・フロー・サイトメトリイ・システム(コウルター・エレクトロニクス社、ハイアレア、FL)でソーティングした。テキサス・レッドはローダミン6Gダイ・レーザーから放射される580 nm光によって励起させた。FITC及びフィコエリスリンは専用の5-6アルゴン・レーザーからの488 nm波長を用いて励起させた。ソーティング・ウィンドウは前方角光散乱(FALS)及びテキサス・レッド蛍光に対して最初に設定した。各蛍光色素に対する陽性は、対照の蛍光の99%よりも大きい蛍光と定義した。細胞を次いで、検出可能なHLA-DR・フィコエリスリン及びCD33-FITC、CD15-FITC、又はCD71-FITCの存在又は非存在によってゲート処理した。

造血原始細胞アッセイ。 細胞を、イスコブ改良ダルベッコ培地中に30%PBS、5x10⁻⁸M2-メルカプトエタノール、1 Uヒト精製エリスロポエチニン(50 U/ng蛋白、トーヨーガー社、大阪、日本)、50 U GM-CSF、及び1.1%メチルセルロースを含む培地1 mlの入った35-mmプラスチック型組織培養皿(コスター・データ・バケティング社、ケンブリッジ、MA)中に種々の濃度に懸濁した。該培養細胞は空気中に5% CO₂を含む湿度100%の環境下、37°Cでインキュベートした。14日後、エリスロポエチニン・バースト(BFU-E)、顆粒球マクロファージ(CFU-GM)、及び混合系(CFU-GEMM)コロニーをそれらの標準的同定基準を用いて倒立顕鏡でそのまま計数した(2)。

高増殖能コロニー形成細胞(HPP-CFC)由来のコロニーを培養28日目に最近発表されたマックニース(McNiece)及び共同研究者らの基準(8)に従って計数した。ヒトHPP-CFC由来のコロニーは発現が遅く、主に顆粒球及びより少數の单球から成る非常に大きい(直径0.5 mm以上)コロニーであり、細胞数はしばしば50,000を越える。

懸濁培養液から除去された細胞を、ブルーノラ(Bruno et al.)によって詳細

に述べられている血清還活法(9)を用いてCFU-巨核球(CFU-MK)コロニーについてアッセイした。1ポイント当たり5x10⁶細胞を35-mm培養皿中の100 UのIL-3を含む血清還活液(ブリリン・クロット1ml中に懸濁し、空気中に5% CO₂を含む湿度100%の環境下、37°Cでインキュベートした。18-24日目に、培養細胞をそのまま固定し、ウサギ抗ヒト血小板球蛋白抗血清及びフルオレセイン結合ヤギIgG(ab⁻)、特異性抗ウサギIgG(タゴ社、バーリンガム、CA)を用いて染色し、巨核球コロニーをツァイス蛍光顕微鏡(カール・ゼイルス社、ニューヨーク、NY)で計数した。陽性のコロニーは3個以上の蛍光細胞を持つ集団と定義した。

B. 実験

48時間毎に反復的にサイトカインを添加供給する液体培養系を細胞群の研究に利用した。CD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞及びCD34⁺ DR⁻ CD71⁻細胞の両方による細胞生産細胞数を表I及びIIに示し、時間毎にこれらの培養中のアッセイ可能なCFU-GMを表III及びIVに記録した。外来性のサイトカインの非存在下では、細胞数は2週間で減少し、アッセイ可能なCFU-GMは1又は2週間しか持続しなかった。IL-1 α の反復添加はCD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞又はCD34⁺ DR⁻ CD71⁻細胞で開始された培養では細胞数又はアッセイ可能なCFU-GM数を変化させなかった。対照的に、IL-6はCD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞で開始された培養により3週目までに細胞数を7倍以上増加させたが、CFU-GMが後出される期間の延長は認められなかった。両方の実験対で、GM-CSFは6週間に渡って細胞生産細胞数の増加を促進し、その時点の細胞数は最初に接種した細胞群中に存在した数の20-80倍を表した。アッセイ可能なCFU-GMは3-4週間持続し、最初の細胞群中のアッセイ可能なそれを漸増的に凌いでいた。細胞増殖の促進、CFU-GM数の増加、及びCFU-GMがアッセイ可能な期間の延長に関して、単独で最も有効なサイトカインはIL-3であった。CD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞及びCD34⁺ DR⁻ CD71⁻細胞は両方とも28日目までに細胞数の200倍の増加を経験し、培養中の1又は2週間後には最初の接種に存在したものと同様又は僅かに多い数のCFU-GMを含有した。アッセイ可能な原始

特表平6-508987 (5)

細胞は IL-3 を加えて維持した場合該システム中に 4-5週間生産され、生存能力のある細胞の数が 8週目でも高く保たれた。IL-1 α 又は IL-6 は IL-3 と組み合わせて加えるとこれらの作用を延長し増強させた。これら 2種類のサイトカインの組合せて経緯的に処理すると CFU-GM は懸濁培養液中で 8 週間後でアッセイ可能であった。付着性細胞層は 8 週間の観察期間を通じていずれの懸濁培養液中にも形成されなかった。

別の実験において、CD34 $^+$ DR $^+$ CD71 $^+$ 細胞を、IL-3 及び IL-6 の両方の組合せの存在下のこの懸濁培養システム中で成育させ、培養 7 日目から 28 日目まで CFU-GM をアッセイした。CFU-GM はこの 28 日の期間を通じて検出された (表 V)。この IL-3/IL-6 サイトカインの組合せを利用して、CD34 $^+$ DR $^+$ CD15 $^+$ 細胞及び CD34 $^+$ DR $^+$ CD71 $^+$ 細胞の長期造血維持能力を CD34 $^+$ DR $^+$ CD15 $^+$ 及び CD34 $^+$ DR $^+$ CD71 $^+$ 分離のそれと比較した (表 VI)。CD15 障性細胞及び CD71 障性細胞は両方とも 2 週間後には CFU-GM を発生しなかった。又、最初に圧倒的多数の BFU-E を含んでいた CD71 障性群が培養中僅か 7 日後にはアッセイ可能な BFU-E を生産しなかった。

これらの懸濁培養中の細胞の観察期間中の形態学的分析から、種々のサイトカインを添加した後の、該細胞群の細胞組成の変化が明らかになった (表 VII 及び VIII)。IL-1 α 及び IL-6 合成の培養は対照サンプルに非常に類似した拳動を示した。サイトカインを加えなかった培養は、1 週間後には 90-100% の芽細胞から成り、CD34 $^+$ DR $^+$ CD15 $^+$ 細胞はサイトカインの非存在下では 2 週間生存しなかったが、CD34 $^+$ DR $^+$ CD71 $^+$ で開始した培養は 2 週間目には 40% の芽細胞及び 60% の単球から成った。IL-1 α を加えた培養は同様の細胞組成であった。IL-6 は両細胞群による顆粒球系統への何らかの分化を促進し: CD34 $^+$ DR $^+$ CD15 $^+$ 細胞は 2 週間目にはかなりの数の成熟顆粒球成分を生産した。GM-CSF は IL-3 と同様に、7 日目にはこれらの懸濁培養中の芽細胞のパーセンテージをかなり減少させた。CD34 $^+$ DR $^+$ CD15 $^+$ 細胞の GM-CSF 合成の培養は 4 週間の間は主に後骨髓液から成ったが、6 週間目には単球へのシフトが起きた。

IL-3 は、CD34 $^+$ DR $^+$ CD15 $^+$ 又は CD34 $^+$ DR $^+$ CD71 $^+$ 細胞のいずれかによって開始された懸濁培養が 3 週間目にはこの成長因子の存在下で 48% の好塩基球から成るという点から独特である (表 VII 及び VIII)。IL-1 α 又は IL-6 の添加はこの傾向

を変化させず、IL-3 合成の培養は全て 3 週間目までには約 50% の好塩基球から成り、培養期間を経てかなりの数の好塩基球を維持した。

該懸濁培養からの部分サンプルからアッセイした造血コロニーの細胞組成は、僅かな例外が認められたことを除けば元のソーティングされた細胞群からアッセイされたものに匹敵した。芽細胞コロニーは HPP-CFU 由来のコロニーと同様に、CD34 $^+$ DR $^+$ CD15 $^+$ 又は CD34 $^+$ DR $^+$ CD71 $^+$ 細胞の直接アッセイにより普通に得られたが、これらのコロニータイプは長期液体培養から得られた細胞の部分サンプルのその後のクローンアッセイには觀察されなかった。GM コロニーサブタイプの構成比はしかしながら、ソーティングされた細胞で開始したもの又は液体培養の 7 日目から 42 日目に開始したものの中のアッセイにおいてもかなり一致しており、およそ 40% が顆粒球/マクロファージ、40% が単球/マクロファージ、及び 20% が好塩基球又は好酸球のコロニーであった。これらの CFU-GM 由来のコロニーのサイズは 100 から 1,000 細胞の範囲であり、平均的なコロニーは 200 ないし 400 細胞を含んでいた。懸濁培養の 8 週間後には、単球/マクロファージコロニーがクローンアッセイで觀察される主なコロニータイプであった。

表 I. 種々のサイトカインを添加した CD34 $^+$ DR $^+$ CD15 $^+$ 細胞の細胞生産率数

サイトカイン	日数							
	0	7	14	21	28	35	42	56
生存能力のある細胞数 $\times 10^3$								
なし	5	1	4	0	0	0	0	0
IL-1 α	5	2	2	0	0	0	0	0
IL-3 α	5	53	140	591	1,085	533	678	781
IL-6 α	5	3	4	36	26	16	0	0
GM-CSF α	5	8	14	44	189	213	118	0
IL-1 α /IL-3 α	5	32	167	556	1,360	1,387	758	1,069
IL-6/IL-3 α	5	47	171	471	854	1,440	1,200	1,216

細胞総数 = 細胞数 / n 培養液 / (1/2) n 、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回数。

α 2.5 U/ n 組み換えヒト IL-1 α を 48 時間毎に加えた; 比活性 = 10^8 CFU/ ug 蛋白。
 α 50 U/ n 組み換えヒト IL-3 α を 48 時間毎に加えた; 比活性 = 10^8 CFU/ ug 蛋白。
 α 75 U/ n 組み換えヒト IL-6 α を 48 時間毎に加えた; 比活性 = 10^7 CFU/ ug 蛋白。
 α 12.5 U/ n 組み換えヒト GM-CSF α を 48 時間毎に加えた; 比活性 = 5×10^7 CFU/ ug 蛋白。

表 II. 種々のサイトカインを添加した CD34 $^+$ DR $^+$ CD71 $^+$ 細胞の細胞生産率数

サイトカイン	日数							
	0	7	14	21	28	35	42	56
生存能力のある細胞数 $\times 10^3$								
なし	5	1	2	0	0	0	0	0
IL-1 α	5	3	0	0	0	0	0	0
IL-3 α	5	40	226	964	748	1,190	1,120	851
IL-6 α	5	1	2	0	0	0	0	0
GM-CSF α	5	3	34	44	45	445	438	0
IL-1 α /IL-3 α	5	23	202	684	1,112	835	800	1,067

細胞総数 = 細胞数 / n 培養液 / (1/2) n 、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回数。

α 2.5 U/ n 組み換えヒト IL-1 α を 48 時間毎に加えた; 比活性 = 10^8 CFU/ ug 蛋白。

α 50 U/ n 組み換えヒト IL-3 α を 48 時間毎に加えた; 比活性 = 10^8 CFU/ ug 蛋白。

α 75 U/ n 組み換えヒト IL-6 α を 48 時間毎に加えた; 比活性 = 10^7 CFU/ ug 蛋白。

α 12.5 U/ n 組み換えヒト GM-CSF α を 48 時間毎に加えた; 比活性 = 5×10^7 CFU/ ug 蛋白。

特表平6-508987 (6)

表III. 各々のサイトカインを添加したCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞による CFU-GM 生産

サイトカイン	週						
	1	2	3	4	5	6	7
	CFU-GM/ml 培養液						
なし	40	0	0	0	0	0	0
IL-1 ⁺	22	14	0	0	0	0	0
IL-3 ⁺	432	696	591	325	0	0	0
IL-6 ⁺	42	242	96	0	0	0	0
GM-CSF ⁺	273	200	219	0	0	0	0
IL-1 ⁺ /IL-3	254	397	444	408	139	152	64
IL-6/IL-3	98	342	236	768	864	1,080	384

CFU-GM 級数 = CFU-GM 数 /ml 培養液 / (1/2)ⁿ 、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回数。

細胞は 5×10^6 /ml 接種した。初期 (0 日目) 細胞群中の CFU-GM = $555/5 \times 10^6$ 倍。コロニーは 50 U/ml GM-CSF を含有するメチルセルロース中で成育させ、14 日後に計数した。

- 2.5 U/ml 組み換えヒト IL-1⁺ を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/mg 蛋白。
- 50 U/ml 組み換えヒト IL-3 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/mg 蛋白。
- 75 U/ml 組み換えヒト IL-6 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10^7 CFU/mg 蛋白。
- 12.5 U/ml 組み換えヒト GM-CSF を 48 時間毎に加えた；比活性 = 5×10^7 CFU/mg 蛋白。

表IV. 各々のサイトカインを添加したCD34⁺ DR⁻ CD71⁻ 細胞による CFU-GM 生産

サイトカイン	週						
	1	2	3	4	5	6	7
	CFU-GM/ml 培養液						
なし	15	4	0	0	0	0	0
IL-1 ⁺	20	0	0	0	0	0	0
IL-3 ⁺	664	272	96	448	119	0	0
IL-6 ⁺	51	14	0	0	0	0	0
GM-CSF ⁺	402	360	135	28	0	0	0
IL-1 ⁺ /IL-3	347	324	342	334	167	240	214

CFU-GM 級数 = CFU-GM 数 /ml 培養液 / (1/2)ⁿ 、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回数。

細胞は 5×10^6 /ml 接種した。初期 (0 日目) 細胞群中の CFU-GM = $690/5 \times 10^6$ 倍。コロニーは 50 U/ml GM-CSF を含有するメチルセルロース中で成育させ、14 日後に計数した。

- 2.5 U/ml 組み換えヒト IL-1⁺ を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/mg 蛋白。
- 50 U/ml 組み換えヒト IL-3 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/mg 蛋白。
- 75 U/ml 組み換えヒト IL-6 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10^7 CFU/mg 蛋白。
- 12.5 U/ml 組み換えヒト GM-CSF を 48 時間毎に加えた；比活性 = 5×10^7 CFU/mg 蛋白。

表V. IL-3 及び IL-6 の組合せを添加した CD34⁺ DR⁻ CD71⁻ 細胞の長期懸濁培養中のアッセイ可能な CFU-MK

培養日数 ^a	CFU-MK/ml 培養液 ^a	
	7	14
7	42.6 ± 7.6 ^b	
14		67.6 ± 56.6
21		17.0 ± 11.8
28		20.2 ± 10.4

50 U/ml 組み換えヒト IL-3 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/mg 蛋白。

75 U/ml 組み換えヒト IL-6 を 48 時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/mg 蛋白。

^a 培養液は 7 日毎に細胞数半減処理を行った。

^b CFU-MK は 100 U/ml IL-3 を含有する無血清フィブリン・クロット培養中でアッセイした。コロニーは培養 18-24 日目に計数した。

各ポイントは 3 回のアッセイの平均 ± SD を表す。値は細胞数半減処理の効果に対する修正を行っていない。

表VI. IL-3 及び IL-6 の組合せにより刺激したソーティングされた細胞群による、 CFU-GM 及び BFU-E の生産細数

細胞群	週						
	1	2	3	4	5	6	7
	CFU-GM (BFU-E)/ml 培養液						
CD34 ⁺ DR ⁻ CD15 ⁻	275(10)	286(4)	64	32	75	0	
CD34 ⁺ DR ⁻ CD15 ⁻	7(1)	26	0	0	0	0	
CD34 ⁺ DR ⁻ CD71 ⁻	220(5)	330(4)	132	18	43	0	
CD34 ⁺ DR ⁻ CD71 ⁻	13	16	0	0	0	0	

CFU 級数 = CFU 数 /ml 培養液 / (1/2)ⁿ 、但し n = それ以前の細胞数半減処理の回数。50 U/ml 組み換えヒト IL-3 : 比活性 = 10^8 CFU/mg 蛋白及び 75 U/ml 組み換えヒト IL-6 : 比活性 = 10^8 CFU/mg 蛋白を 48 時間毎に加えた。細胞は 5×10^6 /ml 接種した。

表VII. 各々のサイトカインを添加した CD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞の分別分析

サイトカイン	日	芽細胞	Pro Myelo	Mk	% Band Seg Eo Baso E Mo							
					7	14	21	28	35	42	48	
対照	7	100										
IL-1 ⁺	7	100										
	14	78										22
IL-6 ⁺	7	100										
	14	27	11	9	13	38	2					
	21	9	48	2	7	17						17
	28		30	4								66
GM-CSF ⁺	7	25	24	27	3	21						
	14	9	1	46	3	21	13					7
	21	3	2	1	52	3	5	22				2
	28	6	1	43	7	3	6	2	32			96
	35		4									
	42		1									99
IL-3 ⁺	7	21	44	35								1
	14	7	7	53								33
	21	8		44								48
	28	5		35	3	9	35					13
	35	2		16	5	20	25					32
	42			15	2	20	20					63
IL-1 ⁺ /IL-3	7	1	5	53	12	14	14					
	14	5		34	9							52
	21	1		53	4	3	31					8
	28	1		42	12	5	32					8
	35			20			27					53
	42			8			8					84
	56						11					89

表VII. (続)

サイトカイン	日	芽細胞	Pro	Myelo	MM	Band	Seg	Zo	Baso	E	No
IL-6/IL-3	7	19	26	2	40	5	4		4		
	14	2	2		46	3	1		46		
	21	5	1		37	1	7		48	1	
	28	4	1		37	10	8		35	5	
	42	1			6	1	9		81		
	56				2		3		95		

分別細胞カウントは液体培養から取り出した細胞のライトーギムザ染色した細胞遠心分離標本で行った。1サンプル当たり200細胞を分類した：スライド上に200未満の細胞しか見られない場合は、全てを分類した。

記号：Pro、前骨髄球；Myelo、骨髄球；MM、後骨髄球；Band、杆状型好中球；Seg、分葉好中球；Eo、好酸球；Baso、好塩基球；E、赤血球；及びNo、単球。

* 2.5 U/ml組み換えヒトIL-6を48時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/ng 蛋白。

* 50 U/ml組み換えヒトIL-3を48時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/ng 蛋白。

* 75 U/ml組み換えヒトIL-6を48時間毎に加えた；比活性 = 10^7 CFU/ng 蛋白。

* 12.5 U/ml組み換えヒトGM-CSFを48時間毎に加えた；比活性 = 5×10^7 CFU/ng 蛋白。

蛋白。

表VIII. 種々のサイトカインを添加したCD34⁺ DR⁻ CD71⁻ 細胞の分別分析

サイトカイン	日	芽細胞	Pro	Myelo	MM	Band	Seg	Zo	Baso	E	No	%
対照	7	90										10
	14	40										60
IL-1 ^a	7	82										18
IL-6 ^a	7	43	4									13
	14	33	20									47
GM-CSF ^a	7	39	33									2
	14	18	5									
	21	4	1	66	9	1						4
	28	2		61	3	1	8					24
	35	14		18	8	8	9					52
	42											100
IL-3 ^a	7	52	40									1
	14	29	26									14
	21	13	4	2	28	2	3					48
	28	14	3		35	5	1					7
	35	9		20	7	6						31
	42	2			5	4						2
IL-1 ^a /IL-3	7	48	42									2
	14	4	1	53	4	5						
	21	3		44	1	1						2
	28	21	3		34	4	3	1	27			8
	35	3		23	4	29			20			21
	42	1		7	3	3			16			70
	56								1	8		91

分別細胞カウントは液体培養から取り出した細胞のライトーギムザ染色した細胞遠心分離標本で行った。

1サンプル当たり200細胞を分類した：スライド上に200未満の細胞しか見られない場合は、全てを分類した。記号は表VIIと同様のものを示す。* 2.5 U/ml組み換えヒトIL-6を48時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/ng 蛋白。* 50 U/ml組み換えヒトIL-3を48時間毎に加えた；比活性 = 10^8 CFU/ng 蛋白。* 75 U/ml組み換えヒトIL-6を48時間毎に加えた；比活性 = 10^7 CFU/ng 蛋白。* 12.5 U/ml組み換えヒトGM-CSFを48時間毎に加えた；比活性 = 5×10^7 CFU/ng 蛋白。

実施例2

長期骨髄培養(LTBMC)を付着性細胞層の非存在下で 5×10^3 細胞/mlのCD34⁺ DR⁻ CD15⁻骨髄細胞で開始し、それにネズミ記調細胞成長因子(MGF)を単独で、又はIL-3又はGM-CSF/IL-3融合蛋白(FP; ウィリアムズら(Williams et al.)、エクスペリメンタル・ヘマトロジイ(Exp. Hematol.)、18巻、第615頁、1990年)と組み合わせて48時間毎に加えた。サイトカインを加えていない培養では、生存可能な細胞は2週間後には検出できなかったが、IL-3、FP、又はMGFを加えた培養は造血作用を10週間維持した。(IL-3又はFPを単独で加えると56日目には細胞数が 10^3 倍増加したが、MGF及びFPの組合せは細胞数を 10^5 倍に増殖させた。(0日目は 5×10^3 細胞；56日目は 5.5×10^8 細胞)。LTBMCの10週間で種々のサイトカインによる処理は、細胞213個のアッセイ可能な造血原始細胞(HPC; CFU-GM+BFU-E+CFU-MK)のインプットに対して以下の累積増加をもたらした：IL-3、86.0; FP、1,265; MGF、2,006; MGF+IL-3、4,845; MGF+FP、155,442。MGFを単独で加えたLTBMCは、IL-3又はFPを加えたLTBMCよりもHPCクローニング効率が高かった。又、MGFを加えるとIL-3及びFPを含有する培養のクローニング効率が増大した。MGFの存在は、これらのサイトカインを加えた培養の最長寿命を延長することになった。

表IX. 種々のサイトカインを添加したCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞の細胞生産細数

サイトカイン	日数	生存能力のある細胞数 × 10 ³
	0	26
IL-3 ^a	5	0
GM-CSF ^a	5	140
FP ^a	5	100
MGF	5	1,400
GM-CSF/IL-3	5	520
MGF/GM-CSF	5	560
MGF/IL-3	5	1,200
MGF/FP	5	10,000

細胞数 = 細胞数 / ml培養液 / (1/n) ⁿ、但し n = それ以前の細胞希釈処理の回数。

細胞は、細胞増殖ができるように、さらに種々の時点で数回の分析を行うために、定期的に分離した。

* 500 pg/ml組み換えヒトIL-3を48時間毎に加えた。

* 200.0 pg/ml組み換えヒトGM-CSFを48時間毎に加えた。

* 10.0 ng/ml組み換えGM-CSF/IL-3融合蛋白を各日毎に加えた。

100.0 ng/mlネズミ組み換え幹細胞因子(SCGF)を48時間毎に加えた。

特表平6-508987 (8)

表X. 各々のサイトカインを添加したCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞の、懸滴培養16日目の分割分析

サイトカイン	芽細胞	Pro	Myelo	MN	Band	Seg	Lymph	Eo	Baso	Mo	Norm
FP	3	7	8	9	27	3	5	2	9	0	5
GM-CSF/IL-3	1	7	4	13	24	32	4	3	4	0	0
MGF	32	4	9	9	13	12	7	1	1	12	0
MGF/GM-CSF	21	10	15	12	14	7	5	2	3	11	0
MGF/IL-3	38	3	15	12	13	4	2	2	4	7	2
MGF/FP	37	17	16	9	9	5	1	0	6	0	5

分別細胞カウントは液体培養から取り出した細胞のライトギムザ染色した細胞遺伝子分離標本で行った。

1 サンプル当たり 200細胞を分類した。使用した記号は、Norm. 正赤芽球；それ以外は表VII と同様のものを示す。サイトカインは表I の説明に詳細に述べたものと同様の用量で加えた。

上記の数式に照らして非常に多くの修正及び変更が本発明には可能である；よって、特に記述された以外に、請求の範囲内で本発明を実施することができる。

実施例3

48時間毎に反復してサイトカインを添加供給する液体培養システムを、2人のドナーから培養された細胞群の研究に利用した。CD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞の細胞生産細数を表II に示し、これらの培養中の各時点のアッセイ可能なCFU-GMを表XIII に記録する。外見性のサイトカインの非存在下では、細胞細数は1ないし2週間で減衰し、アッセイ可能なCFU-GMは1ないし2週間しか持続しなかった。ドナー1 では、MGF/FPの組合せのサイトカインは8週間に渡り細胞生産細数の増加を促進し、その時点での細胞数は最初に接種した細胞群中に存在した数の 110×10^3 倍以上を示していた。ドナー2 では、同じ組合せのサイトカインは6週間に渡り

た。

表VI は、原始細胞のコロニー形成ユニットを生じさせる細胞細数のパーセンテージを示している。MGFでのパーセンテージは高いが、MGFを加えた培養の全体的な増殖は実質的でない。しかしながら、MGF/IL-3サイトカインを加えた培養は高いブレーティング・パーセンテージ及び実質的な全体的増殖をもたらす（表XI-XV を参照のこと）。

表XI. 各々のサイトカインの非存在下で培養されたCD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞の細胞生産細数

サイトカイン	生存可能細胞数 $\times 10^3/\text{ml}$									
	週									
	1	2	3	4	6	8	10	ドナー1		
なし	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-3 ^a	28	144	271	560	480	762	980			
GM-CSF ^b	12	107	436	1,085	2,680	8,080	1,760			
IL-3/GM-CSF ^c	23	244	742	1,620	1,979	2,035	2,720			
PP ^d	42	262	587	1,240	3,000	1,494	480			
MGF ^e	8	104	933	N.D. ^f	1,680	1,780	640			
MGF/FP	101	1,211	35,100	101,000	262,400	550,000	100,000			
MGF/IL-3	38	213	978	2,820	10,800	3,680	5,120			
ドナー2										
なし	1	0	0	0	0	0	0			
IL-3	24	180	650	605	1,400	860	864			
PP	41	810	2,100	6,680	1,840	4,320	5,280			
MGF	8	27	71	98	230	70	0			

細胞生産細数の増加を促進し、その時点での細胞数は最初に接種した細胞群中に存在した数の 15×10^3 倍以上を示していた。MGF/FPの組合せのサイトカインを加えて培養したドナー1 及びドナー2 におけるアッセイ可能なCFU-GMは、それぞれ 6-8週間及び 3-4週間持続し、最初にアッセイ可能なCFU-GM数を有意に増加していた。

MGF/IL-3の組合せのサイトカインは細胞生産細数をドナー1 では6週目に、ドナー2 では8週目に最初に接種した細胞数の 2×10^3 倍以上に増加させた。さらに、生存可能な細胞数は10週間を経て高く保たれる。MGF/IL-3の組合せのサイトカインを加えて培養したドナー1 及びドナー2 におけるアッセイ可能なCFU-GMの増殖は各ドナーにおいて 6-8週間維持され、それぞれ最初にアッセイ可能なCFU-GM数を有意に増加していた。

CD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞による BFU-E 生産細数を表XIV に示す。ドナー1 及びドナー2 において、MGF/FPの組合せのサイトカインではそれぞれ 1-2週間及び 3-4週間持続したが、ドナー2 だけが最初にアッセイ可能なCFU-E 数からの有意の増加を示した。MGF/IL-3の組合せのサイトカインではドナー1 において 2-3週間、ドナー2 において 3-4週間持続し、両方とも 1-2週間は最初にアッセイ可能なCFU-E 数からの有意の増加を示した。

CD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞による CFU-MK 生産細数を表XV に示す。ドナー1 及びドナー2 の両方において MGFI-IL-3の組合せのサイトカインは10週間を経て CFU-MK を維持し、それぞれ最初にアッセイ可能なCFU-MK数を有意に増加していた。ドナー1 及びドナー2 はそれぞれ 6-8週間及び 8-10週間 CFU-MK の維持を示し、両方とも最初の CFU-MK 数からの有意の増加を示した。

観察期間中におけるドナー1 の懸滴培養中の細胞の形態学的分析から、個々のサイトカインを添加した後の該細胞群の細胞組成の変化が明らかになった。これを、CD34⁺ DR⁻ CD15⁻ 細胞の分割分析を示す表XII に表している。MGF/FPを加えた培養は14日目には 11% の芽細胞から成り、MGF/IL-3を加えた培養は14日目には 17% の芽細胞から成った。14日目の芽細胞のパーセンテージが最も高かったのは MGFを单独で加えた培養であり、30% の芽細胞から成った。対照的に、IL-3及び FP を含有する培養では芽細胞のパーセンテージは14日目にはかなり減少してい

MGF/FP	100	1,280	15,700	6,400	81,000	19,520	0
MGF/IL-3	36	305	780	1,380	6,960	10,400	5,440
ドナー 3							
MGF/FP	N.D.	5,040	14,400	14,800	8,960		

全細胞 = 細胞 / ml 培養物 / (n) ^g (但し n = それ以前の細胞数半減処理の回数である)

培養物は 5×10^3 細胞/ml で接種した。

^a 500 pg/ml 組換え体ヒトIL-3を4-8時間毎に添加した；

比活性 3.5×10^6 CFU/mg 蛋白質

^b 250 pg/ml 組換え体ヒトGM-CSFを4-8時間毎に添加した；

比活性 2×10^6 CFU/mg 蛋白質

^c 10 ng/ml 組換え体ヒトIL-3を4-8時間毎に添加した；

比活性 1-2 $\times 10^6$ CFU/mg 蛋白質

^d 50 ng/ml 組換え体ヒトIL-6を4-8時間毎に添加した；

比活性 10^6 CFU/mg 蛋白質

^e N.D. 検出せず

特表平6-508987 (9)

表 XII
様々なサイトカインで培養後のCD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞の分別分析

サイトカイン	日	芽細胞	Pro	Myelo	Meta	Band	Seg	Baso	Eos	Mono	%
POST SORT	0	82	1	1				6	10		
IL-3 ^a	7	10	8	16	2		9	50	2	3	
	14	2	4	39	4	3	10	28		10	
	28	3	6	13	3	1	6	61		7	
PP ^b	7	10	21	52	5		2	7		3	
	14	1	4	17	8	3	20	14		33	
	28	1	24	7	4	36	8	20			
MGF ^c	7	54	39	9			1	3			
	14	30	38	9	1	1	1	20			
	28	1	7	21	18	13	15	1	1	23	
MGF/PP	7	29	22	23	3		4	18		1	
	14	11	22	16	4	2	4	13		28	
	28	1	8	13	12	2	10	2		52	
MGF/IL-3	7	31	15	48			2	4			
	14	17	14	9	2	4	8	34		12	
	28	8	46	17	2	17	2	8			

分化細胞計測は、培養液から取り出した細胞のライトーギームサ染色細胞の追心分離標本において行われた。全100細胞/サンプルを分類した。記号: Pro 前骨髄球; Myelo 骨髄球; Meta 後骨髄球; Band 粒状好中球; Seg 分葉好中球; Baso 好塞性球; Eos 好酸球; Mono 嘴球。

^a 500 pg/ml組換えヒトIL-3、比活性3.5×10⁵ CFU/mg 蛋白質

^b 10ng/ml組換えヒトPP、比活性1-2×10⁵ CFU/mg 蛋白質

表 XIII
様々なサイトカインの存在下に培養されたCD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞による全CPU-GM産生 CFU-GM/ml 培養物^a

サイトカイン	通					
	1	2	3	4	6	8
ドナー 1						
なし	8	0	0	0	0	0
IL-3 ^a	132	28	80	N.D. ^b	N.D.	128
GM-CSF ^c	192	112	88	N.D.	128	0
IL-3/GM-CSF	186	104	36	N.D.	128	576
PP ^d	86	112	128	176	N.D.	64
MGF ^e	290	396	808	448	96	0
MGF/PP	378	1,600	14,800	38,000	80,000	0
MGF/IL-3	144	348	104	416	2,528	192
ドナー 2						
なし	0	0	0	0	0	N.D.
IL-3	232	196	96	16	64	N.D.
PP	84	148	288	320	544	N.D.
MGF	106	152	380	64	128	N.D.
MGF/PP	114	1,440	10,600	N.D.	N.D.	N.D.
MGF/IL-3	62	240	504	32	1,024	N.D.

表 XIV
様々なサイトカインの存在下において培養されたCD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞による全BFU-E 産生 BFU-E/ml 培養物^a

サイトカイン	通			
	1	2	3	4
ドナー 1				
なし	0	-	-	-
IL-3	24	0	0	0
GM-CSF	8	0	0	0
IL-3/GM-CSF	22	4	0	0
PP	20	4	0	0
MGF	8	40	0	0
MGF/PP	98	0	0	0
MGF/IL-3	238	4	0	0
ドナー 2				
C	0	-	-	-
IL-3	40	28	0	0
PP	132	68	56	16
MGF	6	0	0	0
MGF/PP	682	100	200	0
MGF/IL-3	1,062	272	40	0

全BFU-E = BFU-E/ml 培養物 / (N) ^a (但しN = それ以前の細胞数半減処理の回数である)

^a 培養物に 5×10³ 細胞/ml で接種した。各点は二つの別々の実験の平均値を表

特表平6-508987(10)

す。初期細胞群において、平均 $CFU-M/5 \times 10^6$ 細胞：ドナー1, 173；ドナー2, 154。コロニーを500 pg/mlGM-CSFおよび1 Uヒト尿エリスロポエチニを含むメチルセルロース中に増殖させ、12日後に数えた。

* 500 pg/ml組換えヒトIL-3を48時間毎に添加した：
比活性 3.5×10^6 CFU/mg蛋白質

* 250 pg/ml組換えヒトGM-CSFを48時間毎に添加した：
比活性 2×10^6 CFU/mg蛋白質

* 10ng/ml組換えヒトPPを48時間毎に添加した：
比活性 $1-2 \times 10^6$ CFU/mg蛋白質

* 50ng/ml組換えヒトMCFを48時間毎に添加した：
比活性 10^6 CFU/mg蛋白質

表 IV

様々なサイトカインの存在下において培養されたCD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞による全CFU-MK産生
CFU-MK/ml培養物¹

サイトカイン	過					
	2	3	4	5	8	10
	ドナー1					
なし	0	0	0	0	0	1
IL-3 ^a	14	74	100	118	48	N.D. ^b
GM-CSF ^a	12	40	20	48	32	0
IL-3/GM-CSF	20	80	96	120	N.D.	N.D.
PP ^a	28	120	184	118	96	64
MCF ^a	6	12	36	20	0	0
MCF/PP	40	120	120	120	N.D.	0
MCF/IL-3	26	90	208	220	128	64

サイトカイン	過					
	1	2	3	4	6	8
ブレーティング効率 ^c (%)						
なし	N.D. ^b	-	-	-	-	-
IL-3 ^a	0.86	0.072	0.023	0.003	0.005	0.009
GM-CSF ^a	1.67	0.105	0.020	N.D.	0.005	0.000
IL-3/GM-CSF	0.96	0.044	0.005	N.D.	0.006	0.028
PP ^a	0.42	0.039	0.019	0.010	0.015	0.002
MCF ^a	2.58	0.493	0.580	0.065	0.031	0.000
MCF/PP	0.65	0.127	0.056	0.029	0.015	0.000
MCF/IL-3	2.10	0.173	0.041	0.008	0.019	0.002

^c ブレーティング効率=計測されたコロニー/培養した細胞×100%。各時点での細胞を計測し、500 pg/mlGM-CSFおよび1 Uヒト尿エリスロポエチニを含むメチルセルロースまたは1 ng/mlIL-3を含むフィブリックロット中で培養し、14日目に測定した。各点は2~4回の別々の実験の平均値である。初期(0日)細胞群の平均クローニング効率: 4.54%

* 500 pg/ml組換えヒトIL-3を48時間毎に添加した：
比活性 3.5×10^6 CFU/mg蛋白質

* 250 pg/ml組換えヒトGM-CSFを48時間毎に添加した：
比活性 2×10^6 CFU/mg蛋白質

* 10ng/ml組換えヒトPPを48時間毎に添加した：
比活性 $1-2 \times 10^6$ CFU/mg蛋白質

* 50ng/ml組換えヒトMCFを48時間毎に添加した：
比活性 10^6 CFU/mg蛋白質

^b N.D. 検出せず

	ドナー2					
	8	0	0	0	0	0
なし	8	0	0	0	0	0
IL-3	26	100	140	140	64	64
GM-CSF	24	40	60	80	32	0
IL-3/GM-CSF	40	120	160	200	64	64
PP	56	120	200	200	96	64
MCF	10	3	60	60	0	0
MCF/PP	56	200	200	200	40	0
MCF/IL-3	34	120	240	260	160	192

全CFU-MK=CFU-MK/ml培養物/(N)^d (但しN=それ以前の細胞数半減処理の回数である)

* 培養物は 5×10^6 細胞/mlで接種した。各点は二つの別々の実験の平均を表す。初期細胞群における、平均CFU-MK/ 5×10^6 細胞=0。コロニーを1 ng/mlIL-3を含むフィブリックロット中で培養し、15日後に数えた。

* 1 ng/ml組換えヒトIL-3を48時間毎に添加した：

比活性 3.5×10^6 CFU/mg蛋白質

* 250 pg/ml組換えヒトGM-CSFを48時間毎に添加した：

比活性 2×10^6 CFU/mg蛋白質

* 10ng/ml組換えヒトPPを48時間毎に添加した：

比活性 $1-2 \times 10^6$ CFU/mg蛋白質

* 50ng/ml組換えヒトMCFを48時間毎に添加した：

比活性 10^6 CFU/mg蛋白質

* 検出せず

実施例 4

血清不含有長期懸濁ヒト骨髓培養系。血清不含有培地は、ポンティングラ(19)によりすでに概略されているように製造された。血清不含有および血清含有培養は両方ともCD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞で開始し、48時間毎にILおよびGM-CSF/IL-3融合分子(PP)を添加した。

表XVIIで明らかなように、血清不含有培地に懸濁された培養物は、比較血清含有培地で観察されたよりも全細胞産生量が非常に低いことが特徴的であった。6週間の観察期間にわたって、これらのLTBMCsは、全細胞数で単に24倍の増加を示したにすぎないが、それでもCFU-GMでは6倍の増加およびCFU-GFP-CFCでは1.8倍の増加が特徴的であった。しかしながら、注目すべきことに、血清不含有培地における原始細胞クローニング効率は、LTBMCの28日後に1.4%であった(表XVII)のに対して、比較の血清含有培地では0.03%のクローニング効率であった。これらの研究により、血清不含有培養系はさらに分化した細胞の産生を損なうことを懸念するが原始細胞数を増殖するために好ましいことが示された。

表 XVII^c

培養日数	細胞数 ×10 ⁶	原始細胞	
		CFU-GM	BPP-CFC
0	10	375	40
14	30	744	9
28	70	1,050	21
42	140	140	42

^c CD34⁺ DR⁻ CD15⁻細胞は血清不含有培地に懸濁し、48時間毎にIL 100ng/mlおよびGFP 10 ng/mlを添加した。

特表平6-508987(11)

参考文献

- Gordon, M.Y., C.R. Dowding, G.P. Riley, and M.P. Greaves. 1987. *J. Cell. Physiol.* 120:150-158.
- Brandt, J.K., R. Baird, L. Lu, E. Srour, and R. Boffman. 1988. *J. Clin. Invest.* 82:1017-1027.
- Dexter, T.W., T.D. Allen, and L.G. Lejtha. 1977. *J. Cell. Physiol.* 91:335-344.
- Roberts, R.A., E. Spooncer, B.K. Parkinson, B.I. Lord, T.D. Allen, and T.M. Dexter. 1987. *J. Cell. Physiol.* 132:203-214.
- Eliason, J.F., B. Thorens, Y. Kindler, and P. Yassalini. 1988. *Exp. Hematol.* 16:307-312.
- Strauss, L.C., R.K. Stuart, and C.I. Civin. 1988. *Blood*. 61:12 22-1231.
- Sieff, C., D. Bicknell, G. Coime, J. Robinson, C. Lee, and M.P. Greaves. 1982. *Blood*. 60:703-713.
- McNiece, I.K., P.M. Stewart, D.M. Deacon, D.S. Tewes, K.M. Zeebo, S.C. Clark, and P.J. Quesenberry. 1988. *Blood*. 74:809-812.
- Brmo, E., R. Bridgell, and R. Hoffman. 1988. *Exp. Hematol.* 16: 371-377.
- Moore, M.A.S., and A.P.C. Sheridan. 1979. *Blood Cells*. 5:297-3 11.
- Buckling, W.G., and D.W. Golde. 1980. *Blood* 56:118-124.
- Gartner, S., and H.S. Kuprian. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77:4758-4759.
- Skovick, F.T., C.N. Abbruzzo, J.K. Brennan, and M.A. Lichtman. 1984. *Exp. Hematol.* 12:327-338.
- Coulombe, L., A.C. Eaves, and C.J. Eaves. 1983. *Blood* 62:291-297.
- Gordon, M.Y., J.A. Hibben, S. Dowding, E.C. Gordon-Smith, and J.E. Goldman. 1985. *Exp. Hematol.* 13:937-940.
- Li, D.L., and G.E. Johnson. 1985. *Nature (Lond.)*. 318:633-638.
- Tsai, S., C.A. Sieff, and D.G. Nathan. 1986. *Blood*. 67:1418-14 26.
- McNiece, I.K., Langley, K.B., and Zeebo, K.M. 1991. *Exp. Hematol.*, 19:226-231.
- Ponting, I.K.D., Heyworth, C.M., Cormier, P., and Dexter, T.W., 4:165-173, 1991.

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の7第1項)

19条補正
(請求の範囲全文の差し替え)

平成5年10月12日

特許庁長官 麻生渡殿

1. 特許出願の表示

PCT/US92/02895

2. 発明の名称

造血細胞を支持するシステム及び方法

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国インディアナ州47402, ブルーミントン,
ビー・オー・ボックス 500, ショーウォルター・ハウス
(書面なし)

名称 インディアナ・ユニバーシティ・ファンデーション

4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206区
電話 3270-6641~6646

氏名 (2770) 弁理士 湯浅恭三

5. 補正書の提出日

平成4年9月2日

6.添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1通

請求の範囲

- 骨髓細胞を、実質的に間質細胞を含まず、実質的に血清を含まず、かつ、MCFと少なくとも1種類の他のサイトカイン(cytokine)との、該細胞を培養するのに有効な組み合わせを含む培養培地中で維持する:ことよりなる、培養培地中で哺乳類の骨髓細胞を培養する方法。
- 骨髓細胞が造血幹細胞である請求項1に記載の方法。
- 骨髓細胞が造血原始細胞である請求項1に記載の方法。
- 骨髓細胞がCD34+DR-CD15+細胞である請求項1に記載の方法。
- 少なくとも1種類の他のサイトカインがIL-1:IL-3:IL-6:GM-CSF/IL-8の融合タンパク質からなる群から選択される請求項1に記載の方法。
- 骨髓細胞を、実質的に血清を含まず、かつ、該細胞を培養するのに効果的な、MCFを含む複数のサイトカイン(cytokine)の組み合わせを含む培養培地中で培養する:ことよりなる、培養培地中で哺乳類の骨髓細胞を培養する方法。
- 培養培地中で培養される、かつ15日を越えない時間で倍に増殖したCD34+DR-CD15+の細胞群。
- 骨髓細胞が造血原始細胞である請求項6に記載の方法。
- 骨髓細胞がCD34+DR-CD15+細胞である請求項6に記載の方法。
- 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖したCD34+DR-CD15+の細胞群。
- 7日以上15日を越えない時間で倍に増殖した請求項1に記載の細胞群。
- 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で

倍に増殖した 細胞の細胞群。

14. 7日以上15日を越えない時間で倍に増殖した請求項13に記載の細胞群。

15. 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した造血幹細胞の細胞群。

16. 7日以上15日を越えない時間で倍に増殖した請求項15に記載の細胞群。

17. 請求項6に記載の方法に従って培養され、かつ15日を越えない時間で倍に増殖した造血原始細胞の細胞群。

18. 7日以上15日を越えない時間で倍に増殖した請求項17に記載の細胞群。

19. 実質上間質細胞を含まず、実質上血漿を含まず、MCFと少なくとも1種類の他のサイトカイン(cytokine)を含み、かつ、15日を越えない時間で倍に増殖した細胞群を有する哺乳類の骨髄細胞増殖培養物からなる組成物。

20. 細胞群が、7日以上15日を越えない時間で倍に増殖したものである請求項19に記載の組成物。

21. 少なくとも1種類の他のサイトカインがIL-1:IL-3:IL-6:GM-CSF/IL-3の融合タンパク質およびGM-CSFからなる群から選択される請求項19に記載の組成物。

22. MCFを含む複数のサイトカインの組み合わせを含み、実質上血漿を含まず、かつ、7日を越えない時間で倍に増殖した細胞群を有する哺乳類の骨髄細胞増殖培養物からなる組成物。

23. 細胞群が、7日以上15日を越えない時間で倍に増殖したものである請求項22に記載の組成物。

24. 培養物が実質的に間質細胞を含まない請求項23に記載の組成物。

25. 培養物が、下記のサイトカインの組み合わせ: IL-3とMCF:およびMGFとGM-CSF/IL-3の融合タンパク質:のうち少なくとも1つを含む請求項23に記載の組成物。

International Application No. PCT/GB92/02395		
According to International Patent Classification (IPC) or in both National Classifications and IPC		
IPC: B12 C15/00 GB: C07K 16/00		
II. DOCUMENTS RECEIVED		
Minimum Documentation Specified ^a Classification Scheme		
Classification Scheme	U.S. 438/240.1	
	Documentation Received other than Minimum Documentation to the extent that such Documentation is Referred to in the Right-hand Column	
A.P.S. Biolog		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ^b		
Category: Classification ^c with indication, where appropriate, of the relevant passage ^d Reference to Date No. ^e		
X	J. Clin. Invest., Vol. 86, Issued September 1990, J. Brandt et al., "Role of c-kit ligand in the expansion of hematopoietic progenitor cells from human bone marrow", pages 932-941, see entire document.	1-38
X/Y	Exp. Hematol., Vol. 18, Issued 1990, D.B. Williams et al., "Enhanced biological activity of a human GM-CSF/IL-3 fusion protein", page 613, see entire document.	1-38/1-39
Y	Blood, Vol. 64, No. 3, Issued August 1984, R. J. DeGraw et al., "Immunoreactive colony-stimulating factor produced in long-term murine bone marrow cultures and the effect of in vitro irradiation", pages 815-826, see entire document.	1-38
Y	Blood, Vol. 73, No. 7, Issued 19 May 1989, M. Kobayashi et al., "Interleukin-3 is significantly more effective than c-kit ligand in supporting the proliferation and maintenance of human bone marrow-derived colony-forming cells in vitro", pages 1836-1841, see entire document.	1-38
IV. OBSERVATIONS		
Data of the Actual Completion of the International Search Date of the Actual Completion of the International Search Report ^f		
15 June 1992 01 JUNE 1992		
International Searching Authority: Examiner of Authorized Officer ^g		
10A/US KAREN COCHRANE CARLSON, PH.D.		

From PCT/GB92/02395 (earliest priority date) May 1992 5

International Application No. PCT/GB92/02395	
FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM THE SECOND SHEET	
<p>X.P. Blood Cells, Vol. 17, No. 2, Issued 29 April 1991, E. F. Sproat et al., "Human CD34+HLA-DR+ bone marrow cells can be induced to undergo megakaryocytic differentiation and undergo multilineage differentiation and long-term in vitro hematopoiesis", pages 287-295, see entire document.</p> <p>X.P. J. Immunol., Vol. 148, No. 3, Issued 01 February 1992, E. F. Sproat et al., "Relationship between cytokine-dependent cell cycle progression and MHC class II antigen expression in human CD34+ HLA-DR+ bone marrow cells", pages 615-620, see entire document.</p>	
V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNPRACTICABLE ^h	
<p>1. <input type="checkbox"/> Data omitted, because they relate to subject matter it is not required to be examined by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Data omitted, because they relate to parts of the International application that do not comply with the present requirements or such an extent that no meaningful examination would not be carried out by this Authority.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Data omitted, because they are redundant, claim not directed in agreement with the request and prior existence of PCT Rule 4.4(d).</p>	
VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKED ⁱ	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in the International application as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> An or related additional search has been directly paid by the applicant, the International search report covers all inventions of the International application.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> An or some of the related additional search has been directly paid by the applicant, the International search report covers only some parts of the International application for which they were paid, specifically stated:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> An or related additional search has been directly paid by the applicant. Consequently, this International search report is referred to the International application mentioned in the cover, it is referred by claim number:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> An or related additional search has been directly paid by the applicant. Consequently, the International search report is referred to the International application mentioned in the cover, it is referred by claim number:</p> <p>5. <input type="checkbox"/> The additional search fees were reimbursed by applicant's patentee.</p> <p>6. <input type="checkbox"/> No search was performed on the part of additional search fees.</p>	

From PCT/GB92/02395 (earliest priority date) May 1992 6

International Application No. PCT/GB92/02395		
B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT, IDENTIFIED FROM THE SECOND SHEET		
Category: Elevation of Document ^j , with indication, where appropriate, of the relevant passage ^k Reference to Date No. ^l		
X.P.	Blood, Vol. 79, No. 3, Issued 01 February 1992, J. Brandt et al., "Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells", pages 634-641, see entire document.	1-38

From PCT/GB92/02395 (earliest priority date) May 1992 6

フロントページの焼き

(72)発明者 ブラント, ジョン
アメリカ合衆国インディアナ州46220, イ
ンディアナポリス, ダグラス・ロード
6312